

研究用試薬エコロジーナ®

非イオン界面活性剤

高感度 AE ELISA キット

(マイクロプレート)

使用説明書

(A法：前処理あり)

簡易な前処理との組み合わせで
水試料中の AE (2~20 μ g/L) を
精度よく定量できます。



非イオン界面活性剤について

家庭用洗剤等への普及により、近年、非イオン界面活性剤の生産量は陰イオン界面活性剤を大きく上回っています。ポリオキシエチレンアルキルエーテル(アルコールエトキシレート、略称 AE, POER)は、非イオン界面活性剤の中で生産量が最も多く、全生産量の約 35%を占めています¹⁾。

水道水中の非イオン界面活性剤の水質基準は、平成15年5月の「水質基準に関する厚生労働省令」改正により「0.02mg/L 以下であること」と定められ²⁾、その測定法として、「固相抽出ー吸光光度法」(PAR 法)が告示されました³⁾。

この方法は、煩雑なクリーンアップ、有害な有機溶剤(トルエン)による抽出操作が必要なほか、酸化エチレン鎖(EO 鎖)長による感度のばらつきなどの問題が指摘されています⁴⁾。

本品は、酵素免疫定量法(ELISA 法)により、環境水中の AE を高感度かつ簡便に測定できるキットです⁵⁾。

測定原理 (競合 ELISA 法)

1. 抗原抗体反応(競合反応)

AE(抗原)と特異的に結合するたんぱく質(抗体)が、マイクロプレート内面に塗布(固相化)されています。

AE に発色用酵素(ペルオキシダーゼ)を結合させた抗原酵素複合体と AE を含む試料をマイクロプレートに加え、抗原抗体反応(競合反応)させます。

2. 酵素反応(発色反応)

競合反応後、洗浄により未反応物を除去し、発色基質(過酸化水素、TMB)を加えます。抗体に結合した抗原酵素複合体の発色用酵素のはたらきで発色基質が着色します。AE 濃度が高い試料では、抗原酵素複合体の抗体への結合量が少ないため、着色が弱くなり、吸光度が低くなります。

3. 濃度の定量

450nm での吸光度(着色の度合い)と AE 濃度との関係から標準曲線を作成します。これを用いて、試料中の AE 濃度を定量します。

キットの特長

1. モノクローナル抗体を使用しているため、製造ロット間で抗体性能にばらつきがなく、環境水中の AE を特異的に検出・測定できます。
2. 測定に必要なサンプル量は 70mL と少量で、採水の手間がかかりません。
3. 水試料を 30%メタノール溶液とすることにより、AE 測定時に起こりやすい吸着ロスを抑制し、精度よく分析できます。
4. 定量範囲は 100%メタノール溶液中の AE 濃度で 10–500 $\mu\text{g/L}$ (ppb)と高感度です。
5. 簡易な前処理との組み合わせで、水試料中の AE 2~20 $\mu\text{g/L}$ (ppb)を精度よく定量できます。
6. 有機溶媒の使用量を低減できます。
7. 前処理から定量まで、4 時間で完了します。[※] ※器具等の準備時間を除きます。
8. 多検体同時測定が可能で、経済的です。

測定時の一般的注意

- 異なるキットの試薬を組み合わせで使用しないでください。
- 試薬は凍結を避けて 2~8°Cで冷蔵保存し、使用期限の過ぎたものは使用しないでください。
- 試薬調製時・測定操作時は、試薬が直接皮膚や目に触れないよう、眼鏡や手術用ゴム手袋などの適切な保護具を使用してください。
- 精度管理のため、繰り返し測定 ($n \geq 2$) を推奨します。

キット構成内容

No.	品名	容量	数量	保存条件	測定前条件
①	抗AEモノクローナル抗体固相化プレート	48 well	2枚	2~8°C	室温
②	AE標準液 C12E07 (0 μg/L, 100%メタノール溶液)	1.5mL	1本		
	AE標準液 C12E07 (10 μg/L, 100%メタノール溶液)				
	AE標準液 C12E07 (40 μg/L, 100%メタノール溶液)				
	AE標準液 C12E07 (100 μg/L, 100%メタノール溶液)				
	AE標準液 C12E07 (500 μg/L, 100%メタノール溶液)				
③	試料着色液	12mL	1本		
④	抗原酵素複合体粉末	7mL用	2本		
⑤	抗原酵素複合体溶解液	7mL	2本		
⑥	20倍濃縮洗浄液	50mL	1本		
⑦	発色液(褐色ビン)	15mL	1本	冷蔵保存	
⑧	発色停止液(黒キャップ)	15mL	1本	室温	
⑨	プレートシール		2枚		
⑩	使用説明書		1部		

＜キットの他に必要な試薬・器材＞

器材例は推奨品であり、弊社で使用可否を確認しておりますが、これらに限定するものではありません。

1. ガラス繊維フィルター(例:アドバンテック社製、品番 36481047, φ47mm) およびろ過に必要な器具
2. 固相カラム (Isolute Multimode 300mg, 3mL, BIOTAGE ジャパン(株)、品番 904-0030-B)
※ 逆相系樹脂、陰イオン交換樹脂、陽イオン交換樹脂の三種混合固相をご使用ください。
3. ガラス遠心沈殿管(円錐、目盛りつき)(例:旭テクノグラス社製、品番 8084CTF)
4. メタノール(高純度品を推奨します)
5. 30%メタノール水溶液
6. アセトン(高純度品を推奨します)
7. 固相抽出マニホールド
8. ディスポーザブル培養試験管(例:旭テクノグラス社製、品番 9832-1310)
※壁面への吸着を防ぐため、試験管は必ずガラス製のディスポーザブル品を使用してください。
9. マイクロマン(1-10 μL) (ギルソン マイクロマン M-10)
10. マイクロピペット(10-100 μL, 30-200 μL, 200-1000 μL) (例:ギルソン ピペットマン P-100, P-200, P-1000)
11. マルチチャンネルピペット(50-300 μL) (例:フィンピペットデジタルマルチチャンネル 8 チャンネル)
12. プレートリーダー(測定波長 450nm) (例:TECAN サンライズリモート 和光純薬工業(株)取扱い)
13. ストップウォッチ(時計)
14. ストリップイジェクター(あると便利です) (例:コーニングゴスター社製、品番 2578)
15. プレートウォッシャー※
※「①抗AEモノクローナル抗体固相化プレート」を2枚同時に使用する場合があります。

キットの準備

本キットを使用する前に、次のとおり準備してください。

● 30分静置し、室温に戻す

- ①抗 AE モノクローナル抗体固相化プレート
- ②AE 標準液
- ③試料着色液（注：B 法では使用しません）
- ④抗原酵素複合体粉末
- ⑤抗原酵素複合体溶解液
- ⑧停止液

● 使用直前まで冷蔵庫で保冷する

- ⑦発色液

● 蒸留水で 20 倍希釈後、冷蔵庫で 30 分以上保冷する

- ⑥20 倍濃縮洗浄液

※洗浄液を分割使用する場合は、1 回の測定に必要な量だけ分取して使用してください。
1well あたり約 1 mL (48well プレートあたり約 50mL) を調製の目安としてください。

【留意事項】

未使用の試薬または調製後次回も使用予定のある試薬は、速やかに冷蔵保存し、定められた期限内にご使用ください。

◆洗浄液・・・・・・・・・・・・希釈後、1 ヶ月以内に使用

測定法(A 法・前処理あり)

高感度AE ELISA測定法としては、A法(前処理あり)・B法(前処理なし)の 2 種類があります。

A法・・・定量範囲：10-500 $\mu\text{g/L}$ (100%メタノール溶液中の濃度として)
固相抽出後の検液をダイレクトに測定できます。

B法・・・定量範囲：3-150 $\mu\text{g/L}$ (30%メタノール溶液中の濃度として)
水試料を 30%メタノール溶液に調製後、ダイレクトに測定できます。

本書では、A 法を用いて、簡易な固相抽出との組み合わせで、2~20 $\mu\text{g/L}$ (水試料中濃度) の AE を精度よく定量する方法をご紹介します。

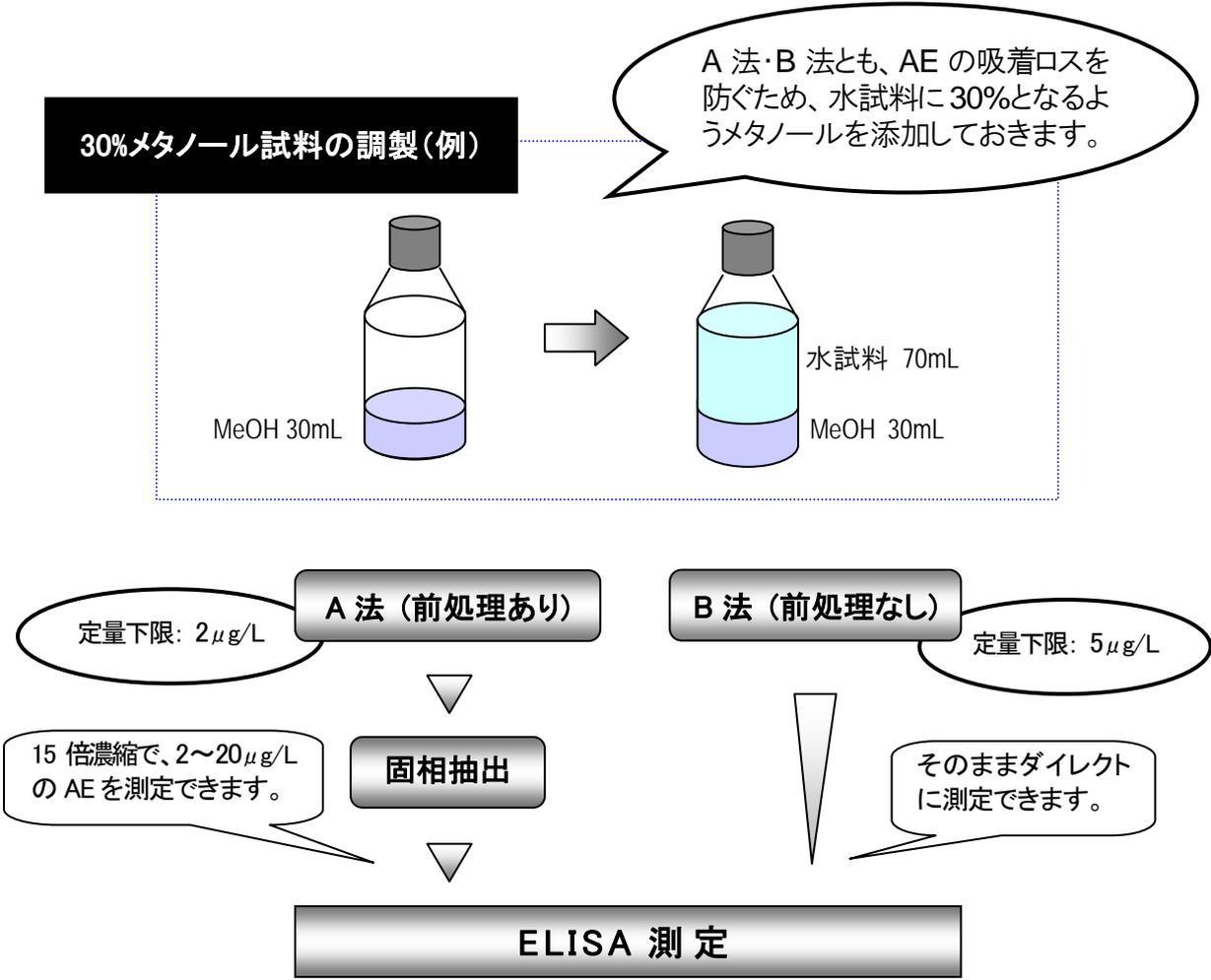


図 1 高感度 AE ELISA キット 測定イメージ

試料調製

【30%メタノール試料の調製】

水試料にメタノールを添加して 30%メタノール試料とします。試料を採取する時点で 30%メタノールに調製することで、AEの容器への吸着を低減できます。

Example

- (1)ガラス容器(例:100mL メジューム瓶)を水洗後、アセトンで 2~3 回リンスし、自然乾燥させます。
- (2)容器にあらかじめメタノールを 30mL 入れておきます。
- (3)水試料 70mL を添加後、転倒混和し、30%メタノール試料 100mL とします。

【固相抽出例(15 倍濃縮)】

固相カラム洗浄液の調製



固相カラム洗浄液として、30%メタノール水溶液を調製します。
(例: メタノール 60mL + 蒸留水 140mL を混合 → 10 検体分)。

器具のアセトン洗浄



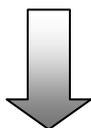
ボルテックスミキサーを用いて、溶出液を受ける遠心沈殿管をアセトン 2mL で 4 回洗浄し、自然乾燥させます。試料調製用フラスコ等も、水洗後、アセトンで2~3回リンスし、自然乾燥させます。

固相カラムのコンディショニング



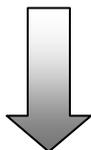
アセトン 5mL、メタノール 5mL、固相カラム洗浄液(30%メタノール水溶液) 10mL の順に通液します(流速 5mL/分程度)。

試料通液・洗浄・乾燥



あらかじめ調製した 30%メタノール試料 100mL のうち、43mL を固相カラムに通液します(水試料として 30mL 分になります)。
次に、固相カラム洗浄液(30%メタノール水溶液)10mL でカラムを洗浄し、水分を除去するため 2 分間吸引します(流速 5mL/分程度)。

AE の溶出



メタノール 2mL を用いて、固相から AE を溶出します(流速 2mL/分程度)。
溶出液は目盛り付きのチューブに受け、溶出液がカラムから出なくなったのを確認します(1.8mL 程度溶出)。
チューブを取り出し、目盛りを見ながら 100%メタノールで 2mL にメスアップします(水試料 30mL を 2mL まで濃縮するため、15 倍濃縮となります)。

AE 測定試料の着色

試料の添加忘れを防止するため、AE 溶出液(100%MeOH)と「③試料着色液」を10:1で混合します(例: AE 溶出液 2mL に着色液を 200 μ L 添加)。
※試料の希釈が必要なときは、100%メタノールと「③試料着色液」を 10:1 で混合し、希釈に使用します。

ELISA 測定

1. 「抗原酵素複合体溶液」の調製

「④抗原酵素複合体粉末」(1本)に、「⑤抗原酵素複合体溶解液(白キャップ)」(1本)を全量(7mL)加えて溶解し、抗原酵素複合体溶液を調製した後、さらに蒸留水5.6mLを添加します。

※B 法とは蒸留水の添加量が異なりますのでご注意ください。

※マイクロピペットを利用し、液中で吸入・排出を2~3回繰り返して混合してください。

2. 抗原抗体反応(競合反応)

室温に戻した「①抗 AE モノクローナル抗体固相化プレート」に、1. で調製した抗原酵素複合体溶液をマルチチャンネルピペットで $90\mu\text{L}/\text{well}$ ずつ分注します。

さらに、マイクロマンを用いて「②AE 標準液」または前ページの「固相抽出例(15倍濃縮)」で調製した AE 測定試料を $10\mu\text{L}/\text{well}$ ずつ添加します(標準液および AE 測定試料の色は黄色から青色に変化します)。

次に、プレートの端を10回程度軽くたたいて液を混合し、「⑨プレートシール」を表面に貼った後、冷蔵庫(4°C)で60分間反応させます。

※マイクロマンのチップ装着方法は通常のマイクロピペットとは異なります。詳しくはマイクロマン使用説明書をご覧ください。

3. 未反応物の除去(洗浄操作)

プレートシールを取り、プレートを裏返して反応液を捨てます。次に、マルチチャンネルピペットを用いて、20倍に希釈後冷蔵しておいた洗浄液を $300\mu\text{L}/\text{well}$ ずつ添加し、プレートを裏返して洗浄液を捨てて洗浄します。同じ作業をもう一度繰り返します(計2回洗浄)。2回目の洗浄液を捨てた後は、裏返したマイクロプレートをペーパータオル等の上で数回叩きつけて(タッピング)、洗浄液をできるだけ除去します。

洗浄操作はできるだけすばやく行い、液を満たした状態で放置しないでください。

※洗浄操作には、①マルチチャンネルピペットを使用する場合(48wellのプレート1枚のみを測定)、②プレートウォッシャーを使用する場合(48wellのプレートを2枚とも測定)の2種類の方法があります。詳しくは後述の「プレートレイアウト(例)」を参照してください。

※測定誤差の原因になりますので、2回目の洗浄後はwellの底に洗浄液が残っていないことを確認してください(気泡が残る場合は無理につぶさないでください)。

※プレート裏面の汚れは吸光度の測定誤差の原因になりますので、手で触れないように注意してください。

※反応液は回収し、AEを水系に直接廃棄しないでください(例:布や紙へ吸い取り、焼却処理)。

4. 発色反応

冷蔵しておいた「⑦発色液(褐色ビン)」をマルチチャンネルピペットで $100\mu\text{L}/\text{well}$ 加え、プレートシールを再び表面に貼って、冷蔵庫(4°C)で30分間反応させた後、「⑧発色停止液(黒キャップ)」をマルチチャンネルピペットで $100\mu\text{L}/\text{well}$ 添加します。

※発色液は4℃に保冷したものを使用してください。

※発色試薬を加えると青色に、発色停止液を加えると黄色に呈色します。

※室温、湿度が高い場合はプレート裏面が曇ることがあります。この場合はキムワイブ等で曇りを軽くふき取ってから吸光度を測定してください（裏面を手で直接触れないようにしてください）。

5. 濃度計算

プレートリーダーを用い、波長 450nm で吸光度(OD)を測定します。方眼紙もしくはパソコンを利用し、100%メタノール溶液中の AE 濃度を算出します。

さらに、次式を用いて水試料中の AE 濃度を算出します。

15 倍濃縮の場合

水試料中の AE 濃度($\mu\text{g/L}$)= 検液中の AE 濃度($\mu\text{g/L}$) \times 1.1/濃縮倍率(15)

(係数 1.1 は、添加した試料着色液由来の補正係数)

(例: 100%メタノール中の濃度が 30.0($\mu\text{g/L}$)となった場合、水試料中の AE 濃度 = 2.2($\mu\text{g/L}$))

※発色反応停止後 15 分以内に測定してください。

※プレート裏面の汚れは吸光度の測定誤差の原因になりますので、手で触れないように注意してください。

※測定は定量範囲内(100%メタノール中の濃度で 10-500 $\mu\text{g/L}$)とし、500 $\mu\text{g/L}$ を越える高濃度の試料は希釈した後、再測定してください。

AE 濃度算出方法

$$\text{阻害率 (B/B0\%)} = (\text{サンプルまたは標準液の OD}) / (\text{AE } 0\mu\text{g/L の時の OD}) \times 100$$

AE 濃度=0 $\mu\text{g/L}$ の時の ODを100%として、各濃度での阻害率(B/B0%)を方眼紙またはパソコンを利用して算出します。

■方眼紙利用:

標準液の AE 濃度($\mu\text{g/L}$)と OD または B/B0%を両対数方眼紙(または片対数方眼紙)にプロットして検量線を作成し、得られた検量線より100%メタノール溶液中の AE 濃度を算出します。

<測定例>

Standard OD or B/B0%

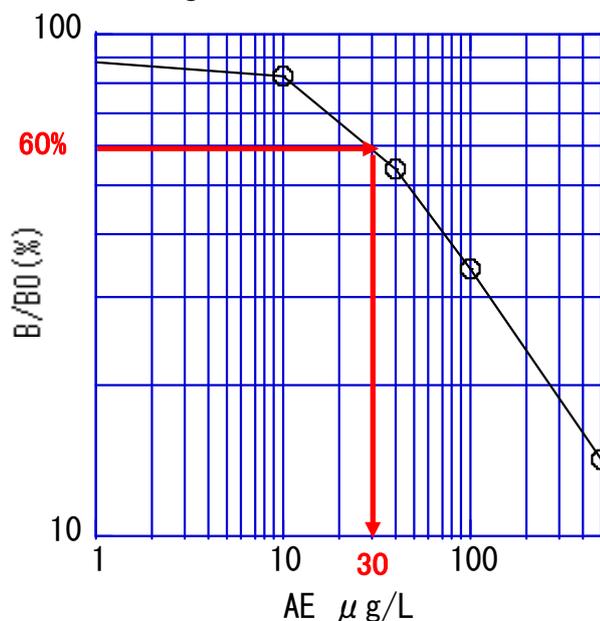
AE($\mu\text{g/L}$)	OD	B/B0%
0	1.405	100.0
10	1.160	82.6
40	0.756	53.8
100	0.480	34.2
500	0.199	14.2

方眼紙からの読み取り例

AE ($\mu\text{g/L}$)	OD	B/B0%
30	(0.843)	60.0

Log-Log Graph Paper Calculation

AE=30($\mu\text{g/L}$) from B/B0%=60%



■パソコン利用:

(1)データ処理ソフトウェアによる計算

市販のデータ処理ソフトウェアを用いて 4-parameter logistic fitting 後、回帰式より 30%メタノール溶液中の AE 濃度を算出します。

データ処理ソフトウェア(例):

デルタソフト(DeltaSoft):BioMetallics, Inc., Princeton, NJ (<http://www.microplate.com>)

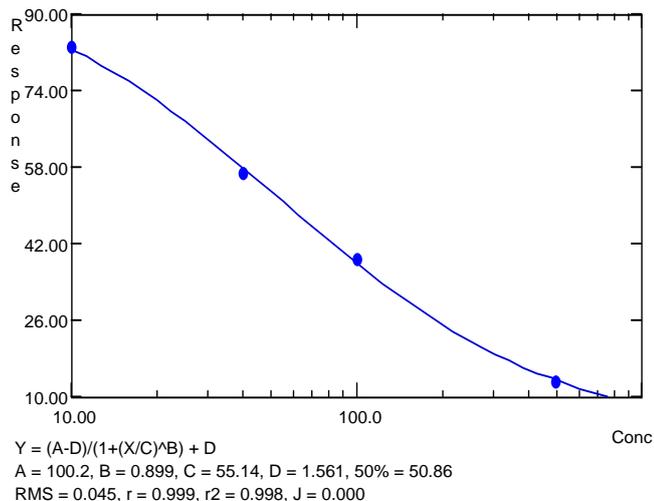
<測定例>

Standard OD or B/B0%

AE(μg/L)	OD	B/B0%
0	1.405	100.0
10	1.160	82.6
40	0.756	53.8
100	0.480	34.2
500	0.199	14.2

4-parameter での計算例

AE (μg/L)	OD	B/B0%
31.2	(0.843)	60.0



(2) エクセルによるLog-Logit変換による計算

エクセルソフトを用いて B/B0 の値を Logit 変換後、対数でフィッティングした回帰式を用いて AE 濃度を算出します。本法では、プロットが完全に直線上に乗らないため、より精度の高い計算には 4-parameter fitting をおすすめします。

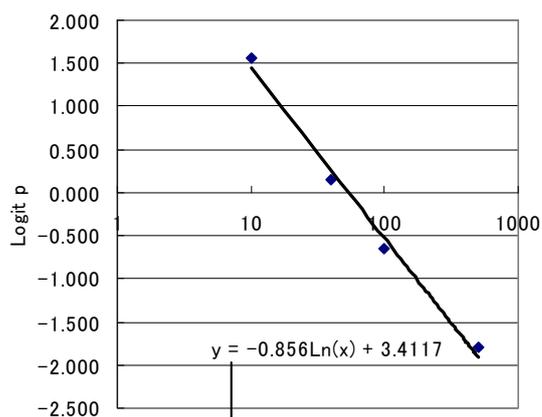
<測定例>

Standard OD or B/B0%

AE(μg/L)	OD	B/B0=p	Logit p LN(p/(1-p))
0	1.405	1	#DIV/0!
10	1.160	0.826	1.558
40	0.756	0.538	0.152
100	0.480	0.342	-0.654
500	0.199	0.142	-1.799

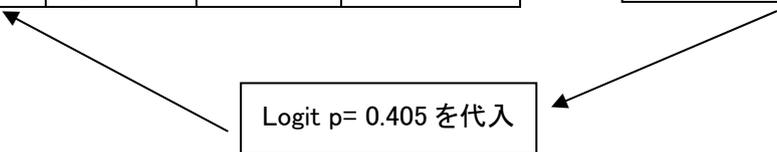
Log-Logit 直線回帰式による計算例

AE(μg/L)	OD	B/B0=p	Logit p LN(p/(1-p))
33.6	(0.843)	0.600	0.405



$$X = \text{EXP}((\text{Logit } p - 3.4117) / -0.856)$$

Logit p = 0.405 を代入



<計算手順>

- 1) 吸光度(OD)を B/B_0 に変換します($B/B_0=p$ とします)。
- 2) エクセル上で B/B_0 を Logit p に変換します(計算式:= $\text{LN}(p/(1-p))$)。
- 3) エクセル上で X 軸に AE 濃度、Y 軸に Logit p をプロットします。
- 4) プロットを右クリックし、「近似曲線の追加」の「種類」から「対数近似(次数2)」を選び近似式を表示させます。また同時に「近似曲線の追加」の「オプション」から「グラフに数式を表示する」を選びます。
- 5) グラフに表示された式を $X=$ の式に変換します。
例: $y=-0.856\text{LN}(x)+3.4117 \rightarrow x=\text{EXP}((y-3.4117)/-0.856)$
- 6) Y に測定対象の Logit p を代入し、濃度を算出します。

プレートレイアウト(例)

本キットには、48well ずつにレイアウトされた「① 抗 AE モノクローナル抗体固相化マイクロプレート」が 2 枚添付されています。

例1) 48wellのプレートを1枚使用する:

AE標準液(100%メタノール)として 5 系列(0, 10, 40, 100, 500 μ g/L)を使用

一回あたりの検体数が 18 検体までなら、48wellのプレート1枚で測定できます (0 濃度標準液はn=4、それ以外はn=2)。この場合の洗浄方法は、本書「5. 未反応物の除去(洗浄操作)」に記載の「マルチチャンネルピペットによる洗浄」となります。プレート内での操作、反応条件によるばらつきを抑制するために以下のレイアウトで測定してください。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A				S1	S1	0	0	S11	S11			
B				S2	S2	0	0	S12	S12			
C				S3	S3	10	10	S13	S13			
D				S4	S4	40	40	S14	S14			
E				S5	S5	100	100	S15	S15			
F				S6	S6	500	500	S16	S16			
G				S7	S7	S9	S9	S17	S17			
H				S8	S8	S10	S10	S18	S18			

例2) 48wellのプレートを2枚とも使用し、一括測定する:

AE標準液(100%メタノール)として 5 系列(0, 10, 40, 100, 500 μ g/L)を使用

48wellプレートを 2 枚とも使用して一括測定する場合は、ストリップイジェクター等を用いてストリップを取り外した後、どちらか 1 枚のプレートにまとめてください。AE標準液として 5 系列をn=2 で使用する場合、42 サンプルを一度に測定することができます(0 濃度標準液はn=4、それ以外はn=2)。なお、この方法では、ばらつきを抑制するために「プレートウォッシャーによる洗浄」が必要となります。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	S3	S3	S11	S11	S19	S19	S27	S27	S36	S36
B	0	0	S4	S4	S12	S12	S20	S20	S28	S28	S36	S36
C	10	10	S5	S5	S13	S13	S21	S21	S29	S29	S37	S37
D	40	40	S6	S6	S14	S14	S22	S22	S30	S30	S38	S38
E	100	100	S7	S7	S15	S15	S23	S23	S31	S31	S39	S39
F	500	500	S8	S8	S16	S16	S24	S24	S32	S32	S40	S40
G	S1	S1	S9	S9	S17	S17	S25	S25	S33	S33	S41	S41
H	S2	S2	S10	S10	S18	S18	S26	S26	S34	S34	S42	S42

抗体の交差反応性

<AE 異性体に対する交差反応性(%)>

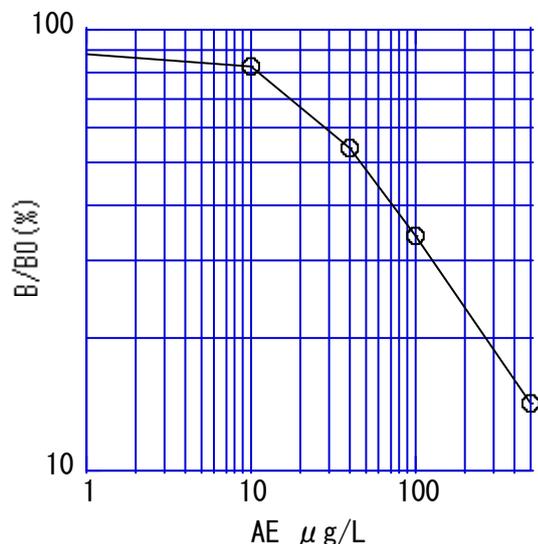
C Chains	EO chains														
	1	2	3	4	5	6	7	8	10	12	14	18	20	23	25
8	-	-	0.4	-	2.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	0.2	0.8	7.5	24	32	38	46	51	-	-	-	-	-	-	-
12	0.8	2.4	19	52	44	79	100	95	69	86	97	-	-	-	41
13	-	-	-	-	-	44	-	-	39	49	-	30	-	-	-
14	0.1	0.3	1.2	3.1	3.3	4.2	5.6	6.5	-	-	-	-	-	-	-
16	-	0.01	0.5	0.3	0.1	0.2	0.2	0.3	-	-	-	-	-	0.3	-
18	0.2	0.03	0.1	0.1	0.2	0.3	0.2	-	0.7	-	-	-	1.0	-	-

—: 標準物質未入手のためデータ未取得

<他の界面活性剤に対する交差反応性(%)>

化合物	交差反応性(%)
非イオン界面活性剤	
AE (C12EO 7)	100
Polyoxyethylene sorbitan (20) monolaurate (Tween 20)	2.0
Nonylphenol ethoxylates (NP10EO)	0.1
Polyethylene glycol (10EO)	<0.1
陰イオン界面活性剤	
Alkylether Sulfate (AES)	13
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	1.1
Sodium Laurate	1.1
Sodium Myristate	0.51
Sodium Palmitate	0.33
Sodium Stearate	0.22
Linear Alkylbenzene Sulfonates (LASs: C9-C13)	<0.1
陽イオン界面活性剤	
Hexadecyltrimethyl Ammonium Chloride	<0.1

AE 標準曲線



定量範囲は 100%メタノール中の濃度で 10~500 μg/L と高感度です。測定値の CV(変動係数)は 10%以下で、ばらつきが少なく、高精度です。

参考文献

- 1) 界面活性剤等統計年報(平成 17 年 6 月)、日本界面活性剤工業会
- 2) 水質基準に関する省令(平成15年5月30日厚生労働省令第101号)
- 3) 水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法(平成15年7月22日厚生労働省告示第261号)別表第28
- 4) 相澤ら (1998) 水道における非イオン界面活性剤の問題、第 1 回日本水環境学会シンポジウム講演集、pp. 5-6
- 5) 郷田ら (2006) 「高感度 AE ELISA の開発」第57回全国水道研究発表会講演集,pp. 638-639

Memo

- ・本キットは研究用試薬であり、疾病の診断またはその補助として使用することはできません
- ・使用説明書は予告なく変更する場合があります。